

참당귀에서 분리한 다당의 면역활성에 대한 당쇄의 역할

신 광 순^{1,*}

¹경기대학교 식품생물공학과

Roles of sugar chains in immunostimulatory activity of the polysaccharide isolated from *Angelica gigas*

Kwang-Soon Shin¹

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University

Abstract To elucidate structure-function relationship of polysaccharide from *Angelica gigas*, the AGE-2c-I was purified by two successive chromatography steps. AGE-2c-I showed a potent anti-complementary activity in a dose-dependent manner. AGE-2c-I with a molecular weight of 140 kDa comprised four monosaccharides and 13 glycosyl linkages, and strongly reacted with β -glucosyl Yariv reagent. For the fine structure analysis of AGE-2c-I, it was sequentially digested by exo-arabinofuranosidase and endo-galactanase. The results indicated that AGE-2c-I was a typical RG-I polysaccharide with side chains such as highly branched α -arabinan, β -(1 \rightarrow 4)-galactan and arabino- β -3,6-galactan. To characterize the active moiety of AGE-2c-I, the anti-complementary activities of AGE-2c-I and its subfractions were assayed. It was observed that the anti-complementary activity of AGE-2c-I was due to the entire structure that resembled RG-I. In addition, arabino- β -3,6-galactan side chain (GN-I) in AGE-2c-I probably plays a crucial role in the anti-complementary activity, whereas α -arabinan side chain (AFN-I) consisting of 5-linked Araf and 3,5-branched Araf partially contributes to the activity.

Keywords: *Angelica gigas*, polysaccharide, rhamnogalacturonan-I, anti-complementary activity, structure-function relationship

서 론

고등식물에 존재하는 다당류는 합성의약품에서 발생하는 독성이나 부작용이 거의 나타나지 않는다는 장점 때문에 현재 건강 기능 식품 소재로 각광받고 있는 물질 중에 하나이다(Schepetkin 과 Quinn MT, 2006). 이제까지 알려진 연구에 의하면 버섯, 효모, 해조류, 생약재 및 식물 유래 천연물에서 분리한 다당은 항보체 활성(Park 등, 2013), 항암활성(Lee 등, 2018; Varghese 등, 2017), 항산화 활성(Samavati과 Manoochehrizade, 2013) 및 면역활성 증진(Yang 등, 2008) 등 여러 생리활성을 가진다고 보고된 바 있다. 이들은 주로 체내의 항상성을 유지하고, 생체반응조절물질(biological response modifier, BRM)로써 작용하여 다양한 기능을 나타낸다고 알려져 있다. 이러한 다당류가 가지고 있는 다양한 생리활성과 활성부위의 상관관계를 규명하기 위해서는 당쇄구조에 관한 연구가 필수적이지만, 구성 분자 사이에 동일한 결합을 갖는 단백질 및 핵산과 달리 다당의 경우 구성당의 다양성, 당쇄 간의 결합양식, α , β 의 아노머 형태, 구성당 간의 배열순서, 직선(linear) 및 가지(branch) 구조 등에 기인하여 상당히 복잡한 과정의 분석과 고도의 분석기술이 요구되고 이를 해석하는데 있어 큰 어려

움이 있다고 보고되고 있다(Lee과 Gray, 1988).

참당귀(*Angelica gigas* NAKAI)는 우리나라를 비롯한 동양권에서 오랜 기간 동안 질병치료와 예방의 목적으로 사용되어온 생약재로써, 항염증 활성(Ma 등, 2009), 항암활성(Lee 등, 2003), 항당뇨 활성(Kim 등, 2008) 및 항알러지 효과(Joo 등, 2010) 등의 약리활성이 확인된 바 있다. 특히 참당귀 뿌리에 decursin과 decusinol angelate가 다량 함유되어 있다고 보고되었는데(Ahn 등, 1998), 특히 decursin은 백혈병 치료와 신장독성 경감, 당뇨성 고혈압 치료 등에 효과가 있으며(Kang 등, 2003), 새로운 기작의 항암제로써의 기능도 확인되어 개별인정형 건강기능성 식품의 원료로 사용되고 있다(Choi 등, 2012). 또한, 당귀에서 추출한 수용성 다당물질에는 항보체활성 및 B-lymphocyte 증식활성, interferon 생산 활성 등이 보고되어 있으며, 이를 Angelan이라 칭하고 다른 다당류들과는 다른 고유의 면역증강 기작을 보인다고 보고되기도 하였다(Kiyohara와 Yamada, 1991).

따라서 본 연구에서는 최근 각광받고 있는 다당 소재를 참당귀로부터 분리 정제하여 선천면역계의 초기 면역반응에 중요한 역할을 하는 항보체에 대한 활성능을 측정하고, 이에 대한 활성물질로 추정되는 다당의 미세 구조를 해석하여 다당 구조와 활성과의 상관관계를 확인함으로써 건강기능성 소재 개발에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에서 사용된 참당귀는 2016년도에 강원도 홍천군에서

*Corresponding author: Kwang-Soon Shin, Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon, Gyeonggi 16227, Korea
Tel: +82-31-249-9655
E-mail: ksshin@kyonggi.ac.kr
Received July 3, 2019; revised July 9, 2019;
accepted July 9, 2019

재배되어 수확한 것을 구입하여 사용하였다.

참당귀로부터 분리한 다당의 분리 및 정제

참당귀 1 kg을 믹서기에 갈아 10배의 증류수를 가하고 처음 부피의 절반이 될 때까지 100°C에서 열수추출하고 원심분리(6,500 rpm, 15 min; Combi514R, Hanil Science Industrial, Seoul, Korea)하여 침전을 제거하였다. 참당귀 열수추출물에 4배 부피의 95% Ethanol를 가하고 1시간 교반한 후 상온에서 다당을 침전시켰다. 이후 원심분리기(6,500 rpm, 10 min)를 이용하여 침전을 분리하고 이를 증류수에 재용해한 후 투석(M.W. cut-off 12,000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 3일간 진행하여 저분자물질을 선택적으로 제거하였다. 투석내액은 회전감압 농축장치를 이용하여 농축한 후, 동결건조(FreeZone 12Liter, Labconco, USA)하여 조다당 시료 AGE-0 획분을 얻었다(Fig. 1).

참당귀에서 분리한 조다당 AGE-0 5 g을 증류수에 녹인 후, 증류수로 평형화된 DEAE-Sepharose FF (Cl- form, 5.5×25 cm) column에 흡착시킨 후, 증류수로 용출시켜 비흡착획분을 분리하고, 이후, 0.05 M-2 M NaCl 용액을 이용, 단계적으로 용출시켜 흡착획분을 fraction collector (1200 series, EYELA, Japan)를 이용하여 각각 분리하였다. 이후, 중성당, 산성당 및 단백질 함량을 측정하여 1개의 비흡착획분(AGE-1a)과 8개의 흡착획분(AGE-2a~AGE-2h)을 얻었다. Anion exchange chromatography를 이용한 정제과정에서 수율이 가장 우수한 것으로 확인된 AGE-2c 획분 일부는 소량의 증류수에 용해하여 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)로 평형화된 Sephadex G-100 column (4×120 cm; GE Healthcare, Uppsala, Sweden)을 이용, gel permeation chromatography (GPC)를 행하였다. 용출액은 7 mL씩 100개의 획분으로 분획하였으며, 중성당 함량 분석실험을 거쳐 분자량이 상이한 2개의 획분 AGE-2c-I과 AGE-2c-II로 분리하였다. 그중 고분자 다당인 AGE-2c-I 획분을 대상으로 농축, 투석 및 동결건조를 행하여 분석용 정제시료로 조제하였으며, 추후 실험에 사용되었다(Fig. 1).

정제다당의 미세구조 규명을 위한 효소처리 단편화

AGE-2c-I 시료 20 mg을 50 mM ammonium formate buffer (pH 4.0)에 용해시키고 1 unit의 α-L-arabinofuranosidase (exo-Arafase, from *A. niger*, Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland)를 가하여 40°C 항온수조에서 48시간 가수분해를 진행하고, 100°C로 15분간 중탕하여 효소 활성을 실험시켰다. 원심분리를 통해 효소 단백을 제거한 상등액을 Superdex™ 200 GL column (GE Healthcare)을 이용하여 HPLC 상에서 수차례 반복적으로 분획하고 중성당 분석을 실시하였다. 이후 탈염(Dowex® 50W×8 200 ion-exchange resin) 및 동결건조를 거쳐 분자량 및 구성 성분이 상이한 2개의 단편획분 AFN-I과 AFN-II를 획득하였다(Fig. 1).

Exo-Arafase 처리 과정에서 얻어진 고분자 획분 AFN-I 시료에 50 mM ammonium formate buffer (pH 4.2)를 가하여 용해시킨 후, endo-1,4-β-galactanase (endo-galnase, from *A. niger*, Megazyme International Ireland Ltd.)를 10 unit를 가하여 50°C 항온수조에서 48시간 가수분해하였다. 잔존효소를 실험시키고자 100°C, 15분간 중탕하고 원심분리하여 상등액을 얻었으며, 이를 Superdex™ 200 GL column을 이용하여 HPLC상에서 수차례 반복적으로 분획하였다. 이후 탈염(Dowex® 50W×8 200 ion-exchange resin) 및 동결건조를 거쳐 분자량 및 구성 성분이 상이한 2개의 획분 GN-I과 GN-II를 획득하였다(Fig. 1).

일반분석방법

다당 시료의 일반성분을 분석하기 위해 갈락토오즈, 갈락투론산, 소혈청알부민 및 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (KDO)를 표준물질로 하여 중성당(phenol-sulfuric acid법) (Dubois 등, 1956), 산성당(m-hydroxybiphenyl법)(Blumenkrantz, 1973), 단백질(Bradford법)(Bradford, 1976) 및 KDO (thiobarbituric acid 법) (Karkhanis 등, 1978) 함량 측정을 진행하였다. 구성당 분석은 Jones과 Albersheim의 방법(1972)을 일부 변형하여 다당시료를 2 M trifluoroacetic acid (TFA)를 이용, 가수분해 후 alditol acetate 유도체로 전환하여 gas chromatography (GC)를 이용, 분석하였다.

β-Glucosyl Yariv reagent를 이용한 arabino-β-3,6-galactan (type II)의 존재확인

Arabino-β-3,6-galactan의 존재유무를 확인하기 위한 β-glucosyl Yariv reagent (Biosupplies, Parkville, Australia)와의 침전환 형성 반응은 Holst와 Clarke의 방법(1985)을 참고하여 single radical 젤 확산법으로 측정하였다. 시료와 β-glucosyl Yariv reagent와의 반응성은 형성된 침전환의 넓이를 측정하여 표준물질로 사용된 gum arabic과의 반응성을 상호 비교하여 계산하였다.

Methylation analysis에 의한 당쇄 결합양식 분석

다당 시료의 결합양식(linkage form)을 확인하기 위해 Hakomori 방법(Narui 등, 1982)을 이용, methylation analysis를 행하였다. 먼저 1 mg의 다당 시료를 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹인 후, methylsulfinyl carbanion (MSCA)와 반응하여 polyalkoxide로 전환시킨 후 iodomethane (CH₃I)을 첨가하여 methyl화 시켰으며, 이를 partially methylated alditol acetate (PMAA)로 전환하여 GC-mass spectrometry (MS)로 분석하였다. GC-MS 분석 조건은 SP2380 capillary column (Supercos Inc., Bellefonte, PA, USA)을 장착한 Agilent 6890N GC system과 5973N mass spectrophotometer를 이용하여 최적온도 조건 [60°C (1 min), 60°C→180°C (30°C/min), 180°C→250°C (1.5°C/min), 250°C (5 min)]에서 splitless injection mode (He Flow rate: 1.5 mL/min)로 분석하였다. 각 당쇄 결합의 mole %는 GC-MS의 relative retention time, peak area 및 molecular response factor로부터 환산하여 계산하였다.

항보체 활성능 측정

항보체 활성은 Meyer법(1964)에 따라 시료에 의한 보체 활성화 후, 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈 정도에 근거를 둔 complement fixation test 방법으로 측정하였다. 한편 항보체 활성은 정상인의 혈청과 GVB⁺⁺, 증류수만으로 반응시킨 음성대조군의 총보체용혈(50% total complement hemolysis, TCH50, %)에 대한 저지율(inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH50, %)으로써 나타내었다. 양성대조군으로는 윤지버섯(Coriolus versicolor) 유래 시판 면역증강제인 PSK (polysaccharide-K)를 사용하여 시료의 활성을 비교하였다

통계처리

모든 실험 결과는 IBM SPSS Statistics 21 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계처리 하였으며 모든 측정 항목에 대한 평균(means)과 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 시료 및 처리 농도간의 유의적 차이는 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple test 일원배치 분산분석으로 실시하였다.

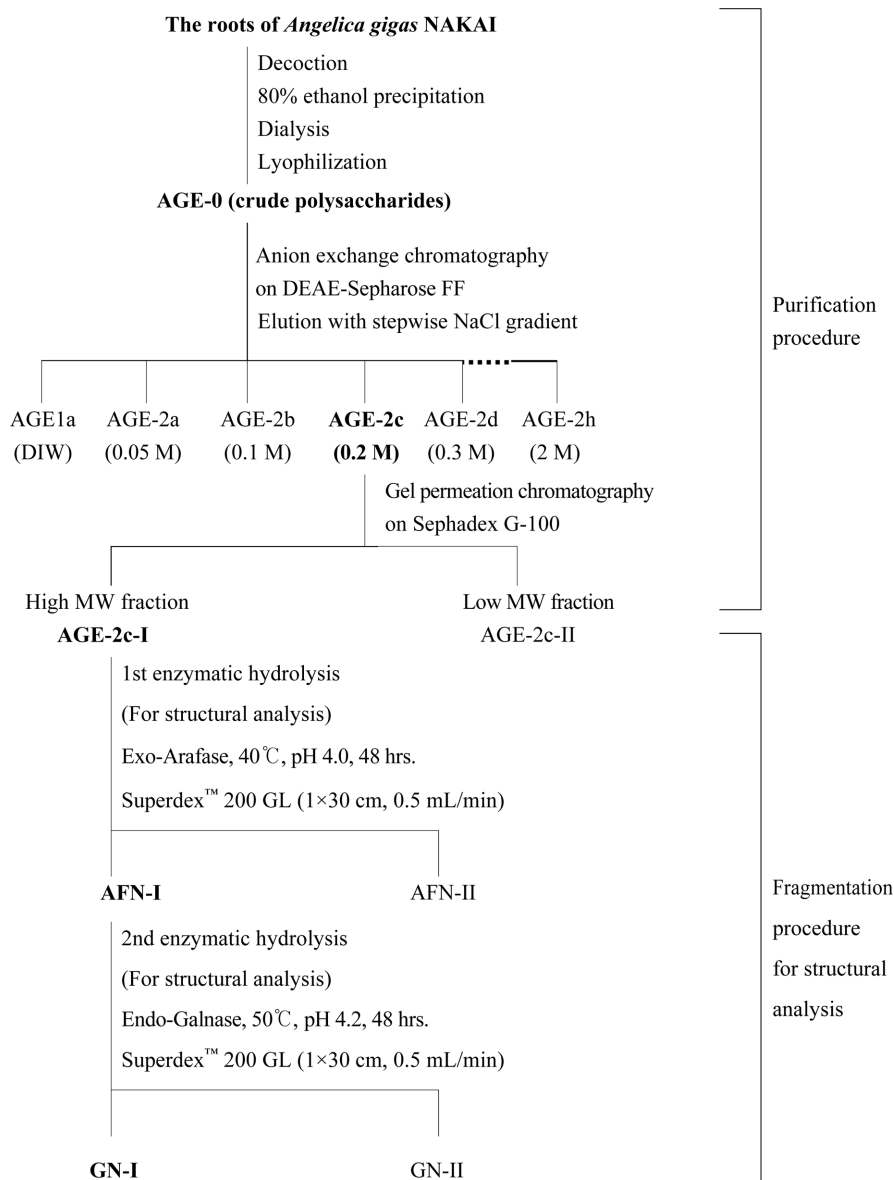


Fig. 1. Isolation and purification of the polysaccharides from *Angelica gigas* NAKAI and sequential enzymatic digestion for structural analysis.

결과 및 고찰

참당귀 유래 정제 다당 AGE-2c-I의 일반화학적 특성

두 차례의 연속적인 ion exchange 및 gel permeation chromatographies에 의해 정제된 참당귀 유래 다당 AGE-2c-I의 일반화학적 특성을 살펴본 결과(Table 1), 분자량 약 140 kDa의 고분자 다당으로 확인되었으며, arabinose 39.1%, galactose 27.5% 및 rhamnose 10.7%를 포함하여 중성당 79.3% 및 산성당 20.7%의 조성으로 구성되어 있음이 확인되었다. 반면, 일반적으로 식물 추출물에서 검출되는 단백질 및 KDO 물질은 함유하고 있지 않았다. 추가적으로, 참당귀 유래 정제다당 AGE-2c-I의 당쇄결합양식을 확인한 결과(Table 1), AGE-2c-I은 총 13종의 당쇄결합이 검출되었으며 arabinose 및 galactose 결합이 높은 비율로 확인되었다. 특히 arabinose 잔기의 경우 terminal-arabinofuranoside (Araf) (7.63%)가 높은 비율로 검출되었는데 이러한 사실은 비환원성 말단에 arabinose가 다량 존재하며 따라서 side chain에 arabinose 및

이들의 oligo당이 고도로 분지된 arabinan 형태 혹은 galactan에 arabinose가 붙어 존재하는 형태임을 추정할 수 있었다. 5-linked-Araf (10.56%)와 3,5-branched-Araf (12.92%)가 높은 비율로 존재하는 사실로부터 arabinan으로 존재하는 경우에는 주쇄가 1→5결합으로 연결된 arabinose chain에 C3위치에서 side chain이 분지된 branched arabinan 형태임을 확인할 수 있었다. 또한 galactose가 높은 비율로 검출되고 특히 4-linked (23.41%)와 6-linked (10.09%) 결합으로 연결된 galactopyranoside (Galp) 잔기가 많은 사실로부터 이들이 (1→4)-galactan 또는 (1→6)-galactan 형태로 존재할 가능성이 있으며, 3-linked (6.28%)와 6-linked Galp (10.09%) 및 3,6-branched Galp (6.63%) 등이 높은 비율로 검출된 사실과 terminal-Araf가 존재하는 것으로 보아 AGE-2c-I 다당에는 고도로 분지된 arabino-3,6-galactan도 일부 포함되어 있을 가능성을 강력히 시사하였다. 위 결과를 종합해보면 참당귀 유래 정제 다당 AGE-2c-I은 arabinan, galactan, arabinogalactan 및 oligosaccharide류가 고도로 분지되어 있는 전형적인 pectin 유래 rhamnogalacturonan (RG)-

Table 1. Chemical properties of AGE-2c-I purified from *Angelica gigas* NAKAI

Chemical composition		AGE-2c-I	
Molecular weight		140 kDa	
Neutral sugar		79.3	
Uronic acid		20.7	
Protein		-	
KDO-liked material ¹⁾		-	
Component sugar (Mole%) ²⁾		Methylation analysis (Mole%)	
		Deduced glycosidic linkage	AGE-2c-I
Rhamnose	10.7	2-	1.64
		2,3-	8.35
Arabinose	39.1	Ter-	7.63
		Ter-	0.85
		5-	10.56
		3,5-	12.92
Galactose	27.5	Ter-	9.36
		3-	6.28
		4-	23.41
		6-	10.09
		3,4-	1.27
		3,6-	6.63
		4,6-	1.01
Glucose	2.2	-	-
Galacturonic acid	20.7	-	-

¹⁾KDO means 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid. Monosaccharides were analyzed using alditol acetates. ²⁾Mole% was calculated from the detected total carbohydrate.

I의 구조(Engelsen 등, 1996)임을 예측할 수 있었다.

참당귀 유래 정제 다당 AGE-2c-I과 β-glucosyl Yariv reagent와의 반응성 검토

AGE-2c-I이 arabinose와 galactose를 높은 비율로 함유하고 있고, 결합양식 결과에서 arabinogalactan으로 존재할 가능성이 있을

것이라 예상되어 이를 확인하기 위해 β-glucosyl Yariv reagent와의 반응성을 검토하였다. β-Glucosyl Yariv reagent [1,3,5-tri-(4-β-glucopyranosyl-oxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxybenzene]는 arabinogalactan 중 II형의 arabino-β-3,6-galactan과 특이적으로 반응하여 적색 침전을 형성하는데 특정 구조의 다당을 선택적으로 확인할 수 있는 유일한 시약으로 알려져 있다(Holst과 Clarke, 1985). 이를 이용하여 AGE-2c-I에 대한 single radial 젤확산을 행한 결과, Fig. 2에 보는 바와 같이 표준물질로 사용된 gum arabic은 농도 의존적으로 침전환이 증가하는 양상을 보여 주었으며, AGE-2c-I의 경우 도 적색 침전환이 관찰되었다. 그 크기는 동일량의 표준물질이 형성한 침전환의 약 51% 정도로 나타났으며(Fig. 2(B)), 따라서 AGE-2c-I의 구조 내에 II형의 arabinogalactan을 상당량을 함유하고 있음을 확인할 수 있었다.

참당귀 유래 정제 다당 AGE-2c-I의 항보체 활성능

체내로 침입하는 외부감염물질에 대해 초기에 반응하는 선천 면역계 인자 중 하나인 보체(complement)에 대하여 참당귀 유래 다당의 활성화 여부를 측정하기 위해 Meyer의 방법에 따라 항보체 활성을 측정한 결과, 농도의존적으로 우수한 활성을 나타내었으며 특히, AGE 2c-I의 1,000 μg/mL의 농도에서 동일 농도로 처리한 양성대조군 PSK에 준하는 우수한 항보체 활성을 보였다(Fig. 3). 양성대조군인 PSK는 현재 항암제로 시판되는 운지버섯 유래 면역활성 다당이며, 일반적으로 1,000 μg/mL의 농도에서 60% 이상의 항보체 활성을 나타내는 다당체는 그 약리활성이 통상적으로 인정된다고 알려져 있으므로(Yamada 등, 1992), AGE 2c-I의 보체계 활성화능이 우수함을 재차 확인할 수 있었다.

참당귀 유래 정제 다당 AGE-2c-I 및 효소처리 단편화분들의 구성당 분석

고분자 다당의 경우 전체구조를 한번에 분석할 수 있는 방법이 현재 개발되어 있지 않으므로 화학적 또는 효소처리에 의해 단편을 조제하고 각 단편의 구성당 및 당쇄결합양식 분석 등을 통해 미세구조를 규명하여 최종적으로 전체 구조를 추정하는 것이 일반적이다(Aspinall, 1982). 참당귀 유래 정제 다당 AGE-2c-I의 전체구조를 규명하고자 구조분석이 용이한 단편(분자량이 작은 oligo당)으로 분해하고 이를 정제하여 해석해야 하므로 이를

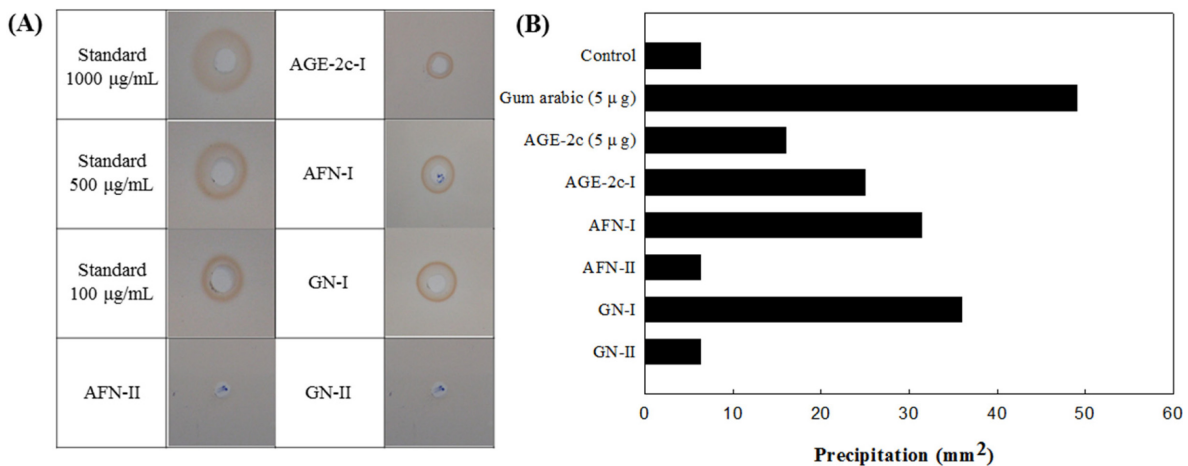


Fig. 2. Single radial gel diffusion (A) and reactivity (B) between β-glucosyl Yariv reagent and AGE-2c-I and its subfractions after serial enzymatic digestion. β-Glucosyl Yariv reagent has specific binding affinity to arabino-3,6-galactan. Gum arabic was used as a positive reference. The samples is a dose of 1000 μg/mL.

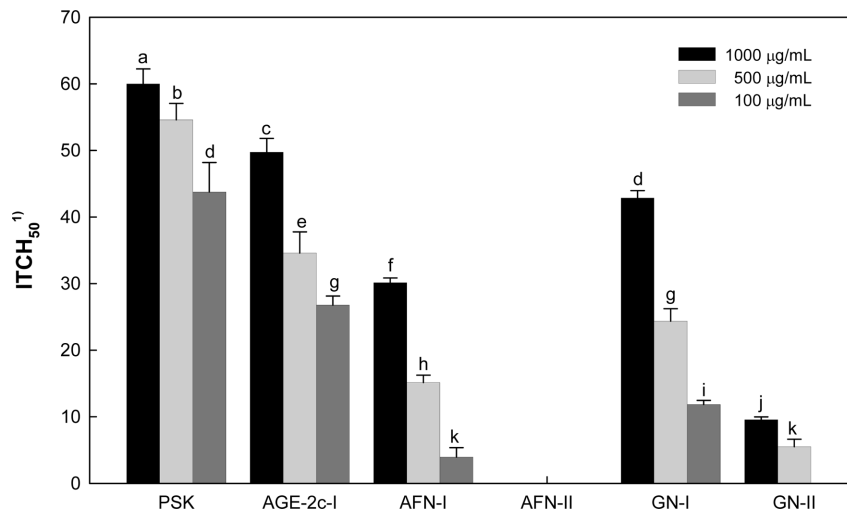


Fig. 3. Anti-complementary activities of AGE-2c-I and its subfractions obtained from serial enzymatic digestion. ¹⁾The anti-complementary activity was expressed as the inhibition of 50% total complement hemolysis by Meyer's method.

위해 exo-Arafase 및 endo-Galnase로 각각 가수분해를 행하여 단편획분 AFN-I과 AFN-II 및 GN-I과 GN-II를 얻었다(Fig. 1). 이 단편획분들의 구성당을 분석한 결과(Table 2), 저분자 획분 AFN-II의 경우 61.17%의 arabinose와 38.83%의 galactose로 구성되어 있었으며, 고분자 획분 AFN-I에서는 AGE-2c-I 대비, 상대적으로 arabinose의 함량이 급격히 감소된 것으로 나타났다. Exo-Arafase에 의해 α -glycosidic linkage로 연결된 arabinofuranoside chain에서 비환원성 말단부터 한분자씩 arabinose를 제거하여 monomer arabinofuranose를 반응물로 만들어 내는 exo-type의 효소이므로 AFN-II는 모두 furanose로 존재하는 arabinose와 일부 이에 연결

된 galactose로 구성되어 있음을 추정할 수 있었다. 또한 AGE-2c-I 주쇄에 붙어있는 arabino-oligosaccharide가 비환원말단으로부터 분해된 결과로, AFN-I은 arabinan 사슬이 많이 제거된 다당 형태 또는 말단 arabinose 잔기가 제거되어 짧은 arabinose가 결사슬로 붙어 있는 galactan으로 존재함을 추정할 수 있었다.

고분자 단편획분 AFN-I에 endo-Galnase를 처리하여 얻어진 저분자 획분 GN-II의 구성당 분석 결과(Table 2), 오직 galactose만이 검출되었는데 이는 본 효소에 의해 β -(1 \rightarrow 4) 결합을 갖는 galactan 부분에서 유리된 galacto-oligosaccharide로 대부분 가수분해 되어 저분자화 되었음을 확인할 수 있었다.

Table 2. Sugar compositions of the AGE-2c-I subfractions after serial enzymatic digestion

	AGE-2c-I	AFN-I	AFN-II	GN-I	GN-II
Rhamnose	4.46	11.02	-	24.15	-
Arabinose	43.49	8.95	61.17	13.28	-
Galactose	52.05	80.03	38.83	62.57	100

참당귀 유래 정제 다당 AGE-2c-I 및 효소처리 단편획분들의 당쇄 결합위치 분석

참당귀 유래 정제 다당 AGE-2c-I의 미세구조를 규명하고자 조제된 단편획분들(AFN-I, AFN-II, GN-I 및 GN-II)의 당쇄 결합양식을 확인한 결과는 Table 3과 같다. Exo-Arafase 처리 후 고분자 획분 AFN-I은 terminal Araf가 7.63%에서 1.77%로 급격히 감소하였으며, 5-linked 및 3,5-branched Araf가 완전한 소실된 것으로

Table 3. Methylation analysis of the AGE-2c-I subfractions after serial enzymatic digestion

Glycosyl Residue	Deduced glycosidic linkage	AGE-2c-I	AFN-I	AFN-II	GN-I	GN-II
Arabinose	T-Araf ¹⁾	7.63	1.77	11.32	3.67	-
	T-Arap ²⁾	0.85	1.84	28.58	0.63	-
	5-Araf	10.56	-	3.17	2.52	-
	3,5-Araf	12.92	-	-	2.98	-
Rhamnose	2-Rhap	1.64	3.90	-	4.09	-
	2,3-Rhap	8.35	16.55	-	15.88	-
Galactose	T-galp	9.36	23.20	21.68	19.94	85.92
	3-galp	6.28	6.18	-	11.91	-
	4-galp	23.41	26.90	8.02	11.24	14.08
	6-galp	10.09	11.55	27.22	13.87	-
	3,4-galp	1.27	-	-	1.13	-
	3,6-galp	6.63	6.70	-	11.15	-
	4,6-galp	1.01	1.39	-	1.00	-

¹⁾T-Araf, and ²⁾T-Arap means non-reducing terminal arabinofuranoside and arabinopyranoside, respectively.

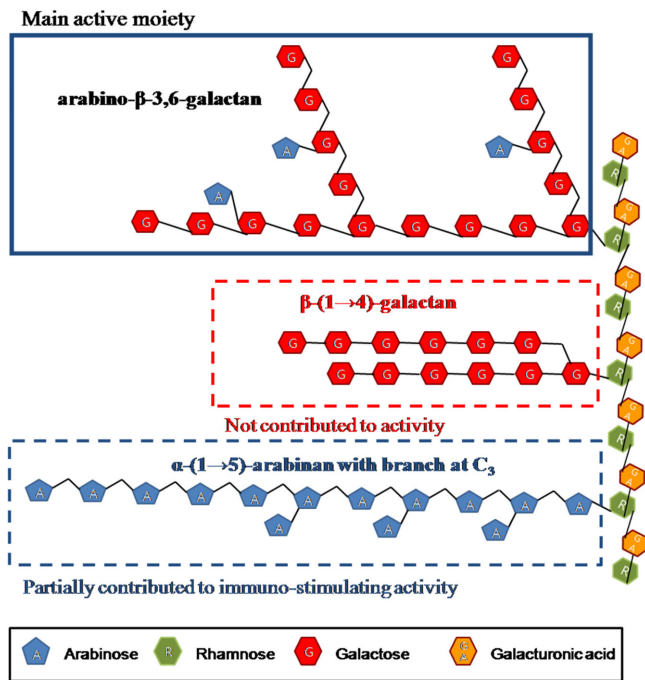


Fig. 4. A possible structure of AGE-2c-I, anti-complementary polysaccharide purified from *Angelica gigas* NAKAI.

보아 전반적인 arabinoside류의 급격한 구성비율의 감소를 보였다. 이러한 사실은 exo-Arafase에 의해 C3 위치에서 측쇄를 갖는 α-(1→5)-arabinan 잔기의 절단에 기인한 것으로 판단되었다. Arabinose 잔기가 효소처리에 의해 급격한 감소 추세를 보인 반면 terminal Galp 잔기는 급격한 증가를 보였다. 이러한 사실은 galactan 주쇄에 짧은 arabinofuranoside들이 α 결합으로 붙어 존재하다가 exo-Arafase의 처리에 의해 분해됨으로써 말단의 galactose 잔기들이 많이 노출된 결과로 해석될 수 있었다. 한편 rhamnose 결합들은 전체적으로 증가 양상을 보였다. 이상의 결과로부터 AGE-2c-I 다당은 C3 위치에서 측쇄를 갖는 α-(1→5)-arabinan을 포함하고 있음을 추정할 수 있었다. Endo-galactinase 처리 후 얻은 고분자 단편획분 GN-I을 대상으로 methylation analysis를 행하고 효소 미처리 획분인 AFN-I과 비교한 결과(Table 3), 효소처리 전 AFN-I에 비해 GN-I은 4-linked Galp의 급격한 감소를 보여 endo-galactinase 처리에 의해 β-(1→4) 결합을 갖는 galactan이 효율적으로 제거됨을 확인할 수 있었다. 이에 반하여 3-linked Galp와 3,6-branched Galp의 비율은 급격히 증가하고 6-linked Galp 및 terminal Araf 또한 증가 양상을 보였는데 이는 β-(1→4)-galactan chain이 효소처리에 의해 제거됨에 따라 arabino-3,6-galactan의 비율이 상대적으로 높아진 것으로 해석되었다.

참당귀 유래 정제 다당 AGE-2c-I 및 효소처리 단편획분들의 β-glucosyl Yariv reagent와의 반응성 검토

참당귀 유래 정제 다당 AGE-2c-I의 미세구조를 규명하고자 조제된 단편획분들(AFN-I, AFN-II, GN-I 및 GN-II)의 β-glucosyl Yariv reagent와의 반응성을 비교한 결과(Fig. 2), AFN-I은 효소처리 전 정제획분 AGE-2c-I (51.00%)보다 다소 높은 반응성(64.00%)을 보였으며 AFN-II는 전혀 반응성을 보이지 않았다. 이러한 결과는 β-glucosyl Yariv reagent가 유일하게 arabino-3,6-galactan과만 높은 반응성을 보이는 점으로 판단할 때, AGE-2c-I

에서 arabinan 형태로 존재하는 사슬이 exo-Arafase에 의해 가수분해되어 제거됨으로써 arabino-3,6-galactan의 상대적 함량이 증가하여 AFN-I의 반응성이 높아지는 것으로 해석되었다. 한편, endo-Galactinase 처리 후 얻은 고분자 단편획분 GN-I은 endo-Galactinase 처리 전 AFN-I에 비해 반응성이 64%에서 74%로 증가하는 양상을 나타냈다.

참당귀 유래 정제 다당 AGE-2c-I의 전체 구조 추정

참당귀 유래 항보체 활성 다당 AGE-2c-I을 두 차례의 연속적인 효소처리 과정을 거쳐 얻어진 단편획분들 (AFN-I, AFN-II, GN-I 및 GN-II)의 구성당 분석, 당쇄결합양식 분석 및 β-glucosyl Yariv reagent와의 반응성 검토를 행하고 이들로부터 얻어진 모든 실험 결과를 종합하였을 때 참당귀의 항보체활성 다당 AGE-2c-I의 예상되는 전체구조는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. 즉 AGE-2c-I은 rhamnose와 galacturonic acid가 번갈아 가며 연결된 주쇄에, rhamnose의 C3위치에 3 종류의 다당 혹은 oligo당이 측쇄 구조로 연결되어 존재할 것으로 추정되었다. 3 종류의 측쇄 구조는 α-(1→5)-arabinan chain, 직선형태의 β-(1→4)-galactan chain, II형의 arabino-β-3,6-galactan일 것으로 최종 추정하였다. 동 구조는 식물체 유래의 다당 중 pectin을 구성하는 rhamnogalacturonan (RG)-I의 전형적인 구조(Engelsen 등, 1996)이며, 따라서 참당귀의 항보체활성은 RG-I에 기인함을 알 수 있었다.

참당귀 유래 정제 다당 AGE-2c-I 및 단편획분들의 항보체 활성을 통한 활성부위 추정

일련의 효소처리 과정에서 얻어진 유효 다당체의 단편획분들을 대상으로 면역활성의 지표로 Meyer's method에 따라 항보체 활성을 기준으로 추정하였다. 그 결과(Fig. 3), 참당귀 유래 유효 다당체 AGE-2c-I의 항보체활성은 exo-Arafase 처리과정을 거쳐 얻어진 AFN-I보다 약간 우세한 것으로 나타나 측쇄로 존재하는 α-(1→5)-arabinan 부위 및 말단 arabinose 잔기가 항보체활성에 일부 공헌함을 확인할 수 있었다. 그러나 endo-Galactinase 처리를 거친 GN-I에서는 β-(1→4)-galactan 부위가 제거되었음에도 AFN-I에 비해 활성이 증가하는 양상을 보임으로써, β-(1→4)-galactan 결사슬은 항보체 활성에 큰 공헌을 하지 못함을 알 수 있었다. 따라서 참당귀 유래 면역활성다당 AGE-2c-I은 RG-I의 특징적 구조를 소유하며, 측쇄로 존재하는 II형의 arabino-β-3,6-galactan 구조가 주된 활성부위로 작용하며, 또 다른 측쇄인 α-(1→5)-arabinan 구조도 일부 활성에 공헌하는 것으로 최종 확인할 수 있었다.

요 약

참당귀 유래 면역활성 다당의 활성과 구조의 상관관계를 규명하고자 조다당 AGE-0로부터 두 차례의 연속적인 컬럼 크로마토 그래피를 실행하여 단일 정제 다당 AGE-2c-I을 얻었다. AGE-2c-I은 농도의존적으로 우수한 항보체 활성을 보여주었으며, 일반화학적 특성을 분석한 결과, 분자량 약 140 kDa의 고분자 다당으로 4종의 구성당과 13종의 당쇄 결합양식으로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다. 이 다당은 β-glucosyl Yariv reagent와의 높은 반응성을 보임으로써 arabino-3,6-galactan의 구조를 가진 rhamnogalacturonan-I 구조임을 추정할 수 있었다. 한편, AGE-2c-I의 미세구조의 해명과 항보체 활성에 관여하는 다당 중의 활성부위 검토를 위해 α-L-arabinofuranosidase와 endo-1,4-β-galactanase를 이용한 연속적 가수분해를 행하고 얻은 단편획분들을 이용, 구성당 및 당쇄결합 양식 분석, β-glucosyl Yariv reagent와의 반응성 검

토 및 항보체 활성 결과를 분석한 결과, 참당귀 유래 항보체활성 다당 AGE-2c-I은 rhamnogalacturonan-I과 유사한 구조를 소유하고 있음이 확인되었으며, AGE-2c-I의 측쇄 구조인 arabino- β -3,6-galactan 사슬이 항보체 활성 발현에 주요 역할을 수행하며, 5-linked Ara와 3,5-branched Ara로 구성된 α -arabinan 측쇄가 활성에 부분적으로 관여하고 있음을 최종 확인할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 경기대학교 연구년 수혜로 연구되었음.

References

- Ahn KS, Sim WS, Kim HM, Han SB, Kim IH. Immunostimulating polysaccharide from cell culture of *Angelica gigas* NAKAI. *Bio-tech. Lett.* 20: 5-7 (1998)
- Aspinall GO. Chemical characterization and structure determination of polysaccharides. Academic Press. New York, NY, USA. pp. 35-45 (1982)
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54: 484-489 (1973)
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of rotein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
- Choi JI, Hong KP, Jang SK, Bae YG. Technology Commercialization of Research Institute Company: A case of the KAERI's Hemo-Him. *APJBVE.* 7: 129-140 (2012)
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers P, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Biochem.* 28: 350-356 (1956)
- Engelsen SB, Cros S, Mackie W, Perez S. A molecular builder for carbohydrates: application to polysaccharides and complex carbohydrates. *Biopolymers.* 39: 417-433 (1996)
- Holst GJ, Clarke AE. Quantification of arabinogalactan-protein implant extracts by single radial gel diffusion. *Anal. Biochem.* 148: 446-450 (1985)
- Jones TM, Albersheim P. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.* 49: 926-936 (1972)
- Joo SS, Park D, Shin S, Jeon JH, Kim TK, Choi YJ, Lee DI. Anti-allergic effects and mechanisms of action of the ethanolic extract of *Angelica gigas* in dinitrofluorobenzene-induced inflammation models. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30: 127-133 (2010)
- Kabat EA, Meyer MM, Charles C. Complement and complement fixation. Thomas Publisher, Illinois, IL, USA. pp. 133-240 (1964).
- Kang YG, Lee JH, Chae HJ, Kim DH, Lee SH, Park SY. HPLC Analysis and Extraction Methods of Decursin and Decursinol Angelate in *Angelica gigas* Roots. *Korean J. Pharmacogn.* (2003)
- Karkhanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ, Carlo DJ. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. *Anal. Biochem.* 85: 595-601 (1978)
- Kim HM, Kang JS, Park SK, Lee K, Kim JY, Kim YJ, Han SB. Antidiabetic activity of angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. *Arch. Pharmacol. Res.* 31: 1489-1496 (2008)
- Kiyohara H, Yamada H. Carbohydrate chains for expression of complement activating activity in pectic polysaccharides from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 64: 167-177 (1991)
- Lee CK, Gray GR. A general strategy for the chemical sequencing of polysaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* 110: 1292-1293 (1988)
- Lee S, Lee YS, Jung SH, Shin KH, Kim BK, Kang SS. Anti-tumor activities of decursinol angelate and decursin from *Angelica gigas*. *Arch. Pharm. Res.* 26: 727-730 (2003)
- Lee SJ, Lee HS, Kim SY, Shin KS. Immunostimulatory and anti-metastatic activity of polysaccharides isolated from byproducts of the corn starch industry. *Carbohydr. Polym.* 181: 911-917 (2018)
- Ma YF, Jung JY, Jung YJ, Choi JH, Jeong WS, Song YS, Kim, MJ. Anti-inflammatory activities of coumarins isolated from *Angelica gigas* Nakai on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Prev. Nutr. Food Sci.* 14: 179-187 (2009)
- Narui T, Takahashi K, Kobayashi M, Shibata S. Permethylated polysaccharides by a modified Hakomori method. *Carbohydr. Res.* 103: 293-295 (1982)
- Park HR, Lee HS, Cho SY, Kim YS, Shin KS. Anti-metastatic effect of polysaccharide isolated from *Colocasia esculenta* is exerted through immunostimulation. *Int. J. Mol. Med.* 31: 361-368 (2013)
- Samavati V, Manoochehrizade A. Polysaccharide extraction from *Malva sylvestris* and its anti-oxidant activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 60: 427-436 (2013)
- Schepetkin I A, Quinn MT. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharmacol.* 6: 317-333 (2006)
- Varghese S, Joseph MM, Aravind SR, Unnikrishnan BS, Sreelekha TT. The inhibitory effect of anti-tumor polysaccharide from *Punica granatum* on metastasis. *Int. J. Biol. Macromol.* 103: 1000-1010 (2017)
- Yamada H, Kiyohara H, Takemoto N. Mitogenic and complement activating activities of the herbal components of jumentaihoto. *Planta Med.* 58: 166-170 (1992)
- Yang X, Zhao Y, Yang Y, Ruan Y. Isolation and characterization of immunostimulatory polysaccharide from an herb tea, *Gynostemma pentaphyllum* Makino. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6905-6909 (2008)